FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

Année 1963 No 58

THESE

PRESENTEE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

PAR

Mme MARK née KLENKLEN Gabrielle

née à Saint-Avold (Moselle) le 29 mars 1936

Ancienne Externe des Hôpitaux de Strasbourg

Etude de l'activité fibrinolytique normale et pathologique des concentrés de leucocytes intacts du sang veineux

---

Président : Mr. G. MAYER, Professeur

FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

Année 1963 No 58

THESE

PRESENTEE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

PAR

Mme MARK née KLENKLEN Gabrielle

née à Saint-Avold (Moselle) le 29 mars 1936

Ancienne Externe des Hôpitaux de Strasbourg

Etude de l'activité fibrinolytique normale et pathologique des concentrés de leucocytes intacts du sang veineux

---

Président : Mr. G. MAYER, Professeur

R.UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

F A C U L T E D E M E D E C I N E D E S T R A S B O U R G

Doyen	MM.	FONTAINE
Doyen honoraire		CALLOT
Assesseur		CALLOT

- Professeurs titulaires -

Anatomie	MM.	MEYER
Anatomie Pathologique		LE GAL
Biologie Médicale		KLEIN
Chimie Biologique		MANDEL
Embryologie		CLAVERT
Histologie		ARON Cl.
Hématologie		WAITZ
Hygiène et Bactériologie		TULASNE
Médecine Légale et Médecine Sociale		CHAUMONT
Parasitologie et Médecine Tropicale		CALLOT
Pharmacologie et Médecine Expérimentale		SCHMID
Physiologie		KAYSER
Physiologie Appliquée		METZ
Physique Biologique		CHEVALLIER
Clinique Chirurgicale A		FONTAINE
Clinique Chirurgicale B		WEISS
Clinique Médicale A		WARTER
Clinique Médicale B		STAHL
Clinique Dermatologique		WORINGER
Clinique de Pédiatrie et Puériculture		SACREZ
Clinique Neurologique		THIEBAUT
Pathologie Nerveuse et Electroencéphalographie		ROHMER
Clinique Gynécologique et d'Accouchement		BURGER
Clinique Ophtalmologique		NORDMANN
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique		GREINER
Chaire de Clinique de Pneumo-Phtisiologie		OUDET
Clinique Psychiatrique		KAMMERER
Pathologie Chirurgicale		JUNG
Chaire de Thérapeutique		METZGER
Chaire d'Electro-Radiologie		GROS
Pathologie Expérimentale		STEPHAN
Stomatologie		VEDRINE
Hydrologie		N.....
Maladies Infectieuses		THIODET
Pathologie Chirurgicale		FEROR
Hématologie		MAYER G.

- PROFESSEURS SANS CHAIRE -

Anatomie	MM. WINCKLER
Anatomie Normale	KORITKE
Anatomie Pathologique	BATZENSCHLAGE
Biologie Médicale	KARLI
Chimie Biologique	WEILL J.D.
Histologie	MARESCAUX
Hygiène et Bactériologie	MINCK
Physiologie	MARX

- MAITRES DE CONFERENCES AGREGES -

MM. APROSIO	MM. ISCH	MM. SCHAFF
CHAMBON	KIRN	SCHNEEGANS
CHAMBRON	LAVILLAUREIX	WARTER P.

- A G R E G E S -

MM. BOCKEL	MM. GRENIER	MM. MARCOUX
BOLLACK	HOLLENDER	MEHL
BRONNER	ISRAEL	MULLER J.N.
BURGHARD	JAHN	MULLER P.
CHAMPY	JUIF	SCHWARTZ
DORNER	KIENY	WEILL J.P.
FINCKER	KLOTZ	WITZ
FRANK	LEVY J.M.	SIBILLY
GANDAR	MANTZ	

- AGREGES LIBRES -

MM. BUCK, FORSTER, KUHLMANN D., KUNTZMANN, VOEGTLIN, BEYER

- CHARGES D'UN COURS D'ENSEIGNEMENT COMPLEMENTAIRE -

MM. MATHIS, Mme MAYER S., MEHL J., MOISE, MUGLER A., SINGER, TISSIER

- PROFESSEURS HONORAIRES -

MM. BARRE	MM. REDSLOB	MM. VAUCHER
BENOIT	ROHMER	VINTEMBERGER
HANNS	ROEDERER	

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle entend ni les approuver, ni les improuver.

- SERMENT D'HIPPOCRATE -

En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples, je promets et je jure au nom de l'Etre Suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerais mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs, ni à favoriser les crimes.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis resté fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

A mes parents

A Jean mon ami

et à nos Petits

Leur manque d'indulgence à mon égard
restera toujours pour moi le meilleur
stimulant.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur G. MAYER

Professeur Titulaire à Titre Personnel

Officier dans l'Ordre des Palmes Académiques

Il nous a confié ce travail, et permis de le mener à bien.

Qu'il veuille trouver ici, le témoignage de notre profonde admiration et de notre gratitude pour la patience qu'il nous a toujours manifestée.

Il a été le premier Maître à nous guider dans un travail de recherche et nous resterons marquée par son enseignement.

A Monsieur le Professeur R. WAITZ

Titulaire de la Chaire d'Hématologie

Commandeur dans l'Ordre National
de la Légion d'Honneur

Qui a bien voulu nous accueillir dans son service et mettre à notre disposition les installations du Centre de Transfusion.

Il nous a toujours témoigné beaucoup de bienveillance. Qu'il veuille trouver ici, l'expression de notre reconnaissance et de notre attachement.

A Monsieur le Professeur A. CHEVALLIER

Titulaire de la Chaire de Physique Biologique

Officier de la Légion d'Honneur

Grâce à qui nous avons pu étudier un certain nombre de cas cités dans ce travail et qui a accepté de faire partie de notre Jury.

Nous le prions d'accepter l'expression de nos remerciements les plus sincères

A Monsieur le Docteur J.D. W E I L L

Professeur sans Chaire

Qui a bien voulu nous marquer son intérêt en acceptant de juger cette thèse.

A Madame le Docteur S. MAYER

Chef de Travaux

Qui nous a guidé dans l'exécution de ce travail. Ses conseils et ses encouragements nous ont été d'un grand secours.

Consciente de ce que nous lui devons, nous la prions de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous tenons à remercier ici toutes les techniciennes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Au cours des maladies hématologiques, on se trouve souvent devant une augmentation de la fibrinolyse. C'est notamment le cas pour un certain nombre de polycythémies et de leucoses. Il est vrai que cette fibrinolyse prend rarement l'aspect dramatique qu'elle revêt en obstétrique ou en chirurgie, mais même ainsi atténuée, elle est persistante, et de la sorte pose différents problèmes. C'est d'abord celui de son origine. Il y a ensuite lieu de se demander si cette fibrinolyse a une signification clinique et pronostique. Enfin, elle soulève un problème pratique car les petites interventions nécessaires en hématologie:trépanoponction et même ponction sternale, peuvent aboutir de son fait à des hémorragies gênantes.

Dans notre travail, nous avons essayé de voir, dans quelle mesure les leucocytes du sang, en totalité ou selon leur lignée, étaient capables d'intervenir dans cette augmentation de la fibrinolyse.

Il est évident qu'il ne nous a pas été possible de résoudre ce problème, mais nous croyons avoir posé quelques jalons.

- I N T R O D U C T I O N -

A.- LES PROTEASES DE LEUCOCYTES ET LA FIBRINOLYSE.

ACHALME en 1899 est incontestablement le premier à avoir fait une étude systématique des protéases des leucocytes. Travaillant sur différentes variétés de pus, cet auteur a mis en évidence trois enzymes protéolytiques: ce qu'il croit être la trypsine, une caséase et une diastase qui liquéfie la gélatine.

Mais plus d'un demi-siècle auparavant, DENIS (1838) observait la lyse rapide de la fibrine en saline dans certaines conditions chez l'homme.

HOFMEISTER (1880) trouvait une grande quantité de peptones dans les collections purulentes (et en concluait que les leucocytes étaient avides de peptones).

BOCHENDAHL et LANDWEHR en 1881, dans un protocole d'autopsi de sujet leucémique, notaient avoir été frappés par la présence de grandes quantités de peptones dans les organes riches en leucocytes.

HAMMARSTEN (1883) découvrait que les leucocytes lavés en saline, possédaient la propriété de lyser la fibrine.

MULLER Fr. (1888) trouvait une relation directe entre la

quantité de peptones et le nombre de leucocytes trouvés dans les crachats.

DASTRE (1894) reprenant les expériences de DENIS, concluait à la digestion sans ferment de la fibrine et à la digestion saline de la fibrine. Il lui reconnaissait l'analogie avec la digestion peptidique, mais hésitait à admettre qu'elle pût lui être identique, car dit l'auteur" à ce moment là on serait obligé d'admettre que ce ferment a une existence quasi universelle."

Il faudra attendre RULOT en 1904 pour voir démontrer le rôle joué par les leucocytes dans l'autolyse de DASTRE.

A partir du début du siècle l'école allemande se montre très riche en publications :

ERBEN (1903) fait les premières recherches d'enzymes sur du sang de sujets atteints de différentes leucoses. Il trouve dans les polynucléaires de ces malades une enzyme analogue à la trypsine, une autre analogue à la pepsine. Il ne les retrouve ni dans les polynucléaires de sujets sains, ni dans les lymphocytes. Les travaux d'ACHALME sont par ailleurs connus de cet auteur.

PFEIFFER (1906) prouve que les lymphocytes contiennent également des protéases.

Puis de 1906 à 1909 nous trouvons toute une série de publications par MULLER, JOCHMANN, KOLACZECK, KANTAROWICZ travaillant en collaboration : ils en arrivent aux conclusions suivantes :

- La protéolyse des leucocytes est due à la fois aux polynucléaires et aux lymphocytes.

- Chaqu'une des deux lignées possède ses enzymes propres l'une agissant en milieu alcalin, l'autre en milieu acide.

- Les enzymes ne sont libérées qu'après la mort cellulaire.

- Elles existent chez le sujet sain comme chez le leucémique.

- La protéolyse est en relation directe avec le nombre de leucocytes dans le sang circulant.

- Le sérum des sujets étudiés, possède un ou plusieurs antiferments.

WIENS, rapporte que la quantité d'antiferment varie suivant les états pathologiques.

NOLF et ses collaborateurs, travaillant dans le même moment de leur côté, expérimentent sur le chien : ils induisent, que la fibrinolyse du sang que l'on observe après choc peptonique, est due à une rupture d'équilibre entre la quantité de fibrinolysine sécrétée par les leucocytes et les parois vasculaires, et l'antithrombine sécrétée par le foie.

OPIE (1905) aux Etats-Unis, fait les mêmes observations que les Allemands, mais s'intéresse davantage aux inhibiteurs sériques.

JOBLING en 1912 et FIESSINGER en 1923 ne font que préciser la nature chimique des diverses enzymes en cause.

La suite des travaux sur les protéases des leucocytes, avec DEMUTH et RIESEN (1928), KLEINMANN et SCHAAR (1932), ne

concerne plus directement l'homme.

En 1960 MOUNTER et ATIYEH montrent que les leucocytes de l'homme contiennent trois enzymes protéolytiques distinctes : deux actives respectivement à un pH optimum de 3 et de 5 et qui sembleraient issues des lymphocytes; une, ayant son optimum d'action à pH 8 : elle proviendrait des polynucléaires pour s'apparenter à la chymotrypsine.

Plus récemment, VANOTTI (1962) dans une brève publication sur ses travaux en cours, écrit avoir noté que "les leucocytes aussi bien que leurs homogénéisats, provoquent la fibrinolyse ....."

JURGENS au même moment, étudiant le système fibrinolytique de la leucémie, trouve dans les leucocytes et les tissus, un activateur du plasminogène. Cet activateur est libéré par la destruction des cellules. Selon l'auteur, il y aurait une relation directe entre la fibrinolyse du plasma, et la quantité de proactivateur libéré par les leucocytes.

D'autre part, BARNHART et RIDDLE, (1963) partant des observations d'ARCHER (1957) concernant les polynucléaires éosinophiles, démontrent que le plasminogène est sécrété par les granulations éosinophiles de ces cellules au niveau de la moelle, et semble libéré dans la circulation à mesure des besoins. Selon des travaux encore plus récents de ces mêmes auteurs, les éosinophiles pourraient jouer un rôle dans le transport du plasminogène vers les tissus.

B.- ACTIVITE FIBRINOLYTIQUE AU COURS DES HEMOPATHIES

L'activité fibrinolytique du plasma, a été trouvée augmentée dans un nombre très étendu et très varié de cas : allant du simple stress d'origine émotif, aux complications de certaines interventions chirurgicales et obstétricales. Cette augmentation est très variable dans son intensité.

Dans le domaine qui nous intéresse ici, celui des hémopathies, nous trouvons décrit par un grand nombre d'hématologistes et de cliniciens, une augmentation de la fibrinolyse ou des perturbations du système fibrinolytique.

FIESSINGER en 1910 publie un cas de "leucémie myélogène" à forme hémorragique, ayant évolué très rapidement vers la mort : les éléments myélocytaires du sang, possédaient un fort pouvoir protéolytique.

GIROUD et CAZAL en 1954, observent un cas de fibrinolyse aiguë au cours d'une leucose myéloïde.

PISCIOTTA et SCHULTZ font une observation à peu près analogue.

VAN CREFELD et MOCHTAR retrouvent dans les plaquettes une antifibrinolysine dont ont déjà parlé JOHNSON et SCHNEIDER.

C'est à une déficience d'antiplasmine que de VRIES et BRAAT peuvent attribuer une forme hémorragique de polycythémie.

CAEN, MATHE, LE XUAN CHAT, BERNARD (1957) trouvent de

façon systématique une augmentation de l'activité fibrinolytique dans la leucose à promyélocytes, la leucose myéloïde chronique à transformation hémoblastique, la pancytopénie idiopathique et la polycythémie.

JURGENS, étudiant le système fibrinolytique de la leucémie trouve dans toutes les formes de la maladie une activation plus ou moins importante du système fibrinolytique.

ROSENTHAL (1963) par contre, distingue un syndrome de leucose à promyélocytes avec hémorragie sévère où ne se trouvent augmenté ni l'activité fibrinolytique du plasma, ni celle des concentrés leucocytaires. Par contre, l'hypofibrinogénémie est importante.

Tous les auteurs depuis ACHALME, ont constaté que,pour que l'activité protéolytique des leucocytes puisse se manifester, il faut que les cellules soient désintégrées:par la chaleur à la suite de MULLER et JOCHMANN;par congélation et décongélation; ultrasonation; traitement par des agents actifs en surface (MOUNTER et ATIYEH).

Notre but n'a pas été de mettre en évidence l'activité protéolytique des leucocytes, mais de voir si des leucocytes morphologiquement aussi intacts que possible étaient susceptibles de provoquer une fibrinolyse.

- Chapitre I -

- T E C H N I Q U E S -

A.- ISOLEMENT DES LEUCOCYTES

1°) Différentes méthodes connues

Les premières études sur les leucocytes, se sont simplement faites en partant de collections purulentes, spontanées ou provoquées.

SZILARD en 1928, isole les leucocytes en lysant les hématies. SINGER, SILBERBACH et SCHWARTZ en 1947, travaillent sur le même principe.

D'après GRABAR ces deux méthodes seraient nocives pour les leucocytes.

SPEAR en 1948 et VALLEE, HUGHES et GIBSON en 1947, utilisent un procédé de flottaison : il demande une manipulation longue et ne permet d'éliminer entièrement ni le sérum, ni les plaquettes.

MINOR et BURNETT en 1943, VANZETTI en 1947, TULLIS en 1952 ainsi que GRABAR en 1955, accélèrent la sédimentation des hématies par divers procédés et recueillent la couche leucoplaquettaire.

DAUSSET en 1954 obtient une sédimentation accélérée en employant le dextran et recueille le sérum pauvre en hématies.

BESSIS en 1954, centrifuge le sang dans un tube étranglé à l'endroit où doivent normalement se déposer les leucocytes.

Toutes ces méthodes ont pour but, de séparer les leucocytes des autres éléments figurés du sang.

2°) Technique de leucoconcentration

C'est la technique d'HERBEUVAL qui nous a servi pour notre travail. Etablie en 1960 pour la mise en évidence de cellules anormales dans le sang, elle possède le mérite d'être à la fois simple et rapide et de permettre l'obtention de cellules morphologiquement intactes.

HERBEUVAL a apporté lui-même récemment des petites modifications à sa technique. C'est plus précisément de la méthode ainsi modifiée, que nous nous sommes servis.

a) - Récolte du sang pour la préparation du concentré leucocytaire

Nous nous servons de sang veineux.

Il est prélevé sur une solution conservatrice particulière à la technique et à parties égales avec celle-ci. La composition en sera donnée plus loin.

En pratique nous procédons de la manière suivante :

- Dans chacun des deux tubes à essai, nous pipetons 5 cm^3 de solution conservatrice fraîchement préparée.
- Nous ponctionnons la veine au pli du coude. Cette ponction doit être franche, le sang doit couler rapidement et directement dans le tube à essai, si l'on veut éviter les caillots. Nous prélevons environ 5 cm^3.
- Nous retournons immédiatement et à plusieurs reprises le tube, afin de bien permettre le mélange. Il s'agit de bien retourner et non pas d'agiter : auquel cas on obtient une mousse abondante, claire, fort gênante pour la suite des manipulations.
- Le sang ainsi prélevé peut rester sans inconvénient à la température du laboratoire pendant quelques heures, ainsi que l'expérience l'a prouvé.

b) Préparation du concentré leucocytaire

Technique de R. HERBEUVAL

On utilise dans cette technique diverses solutions :

1) - Solution conservatrice ou solution-mère :

a)

Cl Na	76,50	g
ClK	2,00	g
CH_3CO_2Na	15,00	g
PO_4H_2K	1,00	g
PO_4H_2Na	0,50	g
CO_3HNa	7,00	g
glucose	10,00	g
acide ascorbique	0,03	g
formol	100	cm^3
eau distillée qsp	1000	cm^3

Certains composants de cette préparation se dissolvent mal dans l'eau distillée et la solution pour être limpide demande une agitation vigoureuse et prolongée.

b)

citrate de soude	50	g
polyvinylpyrolidone	160	g
eau distillée qsp	1000	cm^3

Les solutions a et b sont préparées séparément, puis mélangées dans un deuxième temps. On ajoute quelques gouttes

de bleu de bromothymol pour colorer la solution et on vérifie que le pH est bien à 7.

Cette solution se conserve à la température du laboratoire sans qu'il y ait lieu de prendre des précautions spéciales. Pour l'utilisation dans la méthode, cette solution est employée diluée.

2) - Solution diluée

15 cm^3 de solution mère sont ajoutés à 100 cm^3 d'eau bidistillée. La solution diluée ne se conserve pas, et doit être préparée juste avant usage.

L'eau bidistillée doit être conservée en chambre froide à 4°.

3) - Solution hémolytique

Celle-ci comprend :

eau	50 cm^3
saponine	1 g
alcool 99°	50 cm^3
formol	2 cm^3

Il faut dans un premier temps, dissoudre la saponine dans l'eau distillée, car si on ajoute l'alcool tout de suite, la dissolution ne se fait plus.

Nous avons conservé la solution hémolytique à la température du laboratoire, après que nous ayons constaté qu'à 4° les délais d'utilisation étaient les mêmes. Il faut la renouveler

environ tous les 10 jours. Nous avons pu constater que dès le lendemain de sa préparation, la quantité nécessaire pour hémolyser une quantité de sang donnée, augmente.

Mode opératoire :

Le mélange sang-solution conservatrice est versé du tube à essai dans un becher de 100 cm^3, et le tube est rincé avec 10 nouveaux cm^3 de solution diluée, qui sont ajoutés dans le becher.

La solution hémolytique est versée goutte à goutte, en imprimant constamment au contenu du becher, un mouvement de rotation. Après 30 à 40 gouttes avec une solution fraîchement préparée, et pour 5 cm^3 de sang provenant d'un sujet normal, brusquement le mélange vire au rouge-brun, brillant translucide, d'aspect laqué. A ce moment, on arrête l'hémolyse en ajoutant en une seule fois 10 nouveaux cm^3 de la solution diluée, et en agitant toujours.

L'ensemble est réparti dans des tubes côniques, et centrifugé 15 mn à 2500 tours/mn.

Après centrifugation on rejette le surnageant qui est limpide. Le concentré leucocytaire reste au fond du tube.

c) - Numération des leucocytes dans le concentré leucocytaire

Elle est destinée à permettre une comparaison valable des résultats : les résultats ne peuvent en effet être comparés, que si l'on utilise pour chaque expérience la même quantité de leucocytes.

0,01 cm^3 de concentré leucocytaire, est prélevé à l'aide d'une pipette mélangeur "à globules blancs" et dilué par de l'acide acétique à 3 %, selon la méthode couramment employée au laboratoire pour les numérations ordinaires.

Nous avons fait nos numérations sur cellules de Thoma.

Pour un sujet normal, le nombre de leucocytes par mm^3 dans le concentré, varie entre $0,9 \times 10^6$ et $1,2 \times 10^6$. Nous n'avons pas eu l'occasion de vérifier si ce chiffre présentait un rapport avec la leucocytose, ou si tout simplement il était en relation avec la quantité de sang prélevée pour une quantité donnée de solution conservatrice.

Lorsque la leucocytose est très élevée, ces chiffres peuvent atteindre 2×10^6. Là non plus, nous n'avons pas tenté d'établir une relation entre les deux valeurs.

d) - Etalements sur lames à partir des concentrés leucocytaires

Ils sont faits selon le même procédé que pour les étalements de sang total, et colorés suivant la même méthode à la différence près que les temps de contact entre frottis et colorants sont beaucoup plus long.

B.- LA PLAQUE DE FIBRINE

ASTRUP et PERMIN dès 1947, se servaient de la plaque de fibrine pour l'étude de la fibrinolyse produite par certains tissus de l'organisme. Dès lors, divers auteurs l'utilisaient couramment.

ASTRUP et MULLERTZ en 1952, n'ont fait que standardiser la méthode. La même année ASTRUP et ALKJAERSIG ont commencé à l'utiliser pour tester l'activité fibrinolytique du plasma. La méthode est modifiée par NILSSON, SJOERDSMA et WALDENSTROM en 1960, après que fibrinogène et thrombine aient été commercialisés et c'est plus précisément d'après leur méthode que nous avons établi la nôtre.

1°) - Méthode proposée

Nous disposons pour nos expériences

- de fibrinogène bovin Poviet (teneur en fibrinogène coagulable : 65 à 69 % suivant les lots)
- de thrombine Roche (à 95 U/mg)
- de tampon Tris à pH 7,8

Préparation du tampon Tris :

- Solution A : Tris (Boehringer) à 0,2 M 50 cm^3
- Solution B : HCl 0,02 32,6 cm^3
- NaCl à 15 g% QSP 200 cm^3

a) - Technique

On commence par préparer une solution de fibrinogène à 0,1 % en tampon Tris. La dissolution du fibrinogène se fait difficilement : dans un becher, nous versons la solution tampon, puis le fibrinogène. Nous agitons vigoureusement, avant de porter au bain-marie à 37°. Nous y maintenons la solution jusqu'à ce qu'elle ait elle-même atteint cette température. A ce moment la solution est trouble : nous la filtrons.

28 cm^3 de cette solution sont alors mesurés dans un verre à pied, et versés dans une boîte de Petri de 12 cm de diamètre. (Il faut prendre soin d'éviter les bulles qui gêneraient ultérieurement les lectures). Pour cela, nous laissons couler le liquide très lentement du verre à pied le long du bord de la boîte tenue penchée.

Le contenu de la boîte de Petri est coagulé par 0,2 cm^3 de thrombine à 100 U NIH/cm^3, ajoutés en imprimant à la plaque un mouvement de rotation pendant quelques instants pour bien faire le mélange.

Nous laissons reposer pendant 3 à 4 mn. Au bout de ce laps de temps, nous avons obtenu des plaques fermes, translucides, collant bien aux parois et au fond de la boîte de Petri. Elles se conserveront ainsi 48 heures à 4°. Passé ce temps, elles subissent une autolyse.

b) - Remarques particulières

La solution de fibrinogène ne doit être préparée qu'au moment de l'emploi : elle ne se conserve pas au-dejà de 2 à 3 heures.

La solution de thrombine peut se conserver de 3 à 4 jours en chambre froide à 4°.

Les plaques de fibrine une fois préparées, doivent être maintenue rigoureusement horizontales, et ceci jusqu'à la fin de l'expérimentation.

2°) - Justification du choix de la méthode

Pour étudier l'activité protéolytique de nos concentrés leucocytaires et de la fraction globulinique du plasma, nous avions à notre disposition plusieurs séries de méthodes. Comme le signale ASTRUP (1956) le choix dans la méthode à une très grande importance, car de ce choix dépendent les résultats obtenus : ceci est dû, au fait de la présence dans le substrat d'activateurs ou d'inhibiteurs du plasminogène.

MULLERTZ en 1955 utilise comme substrat la caséine.

TROLL, SHERRY et WACHMANN en 1954, les esters amino-acides

Mais la plupart des auteurs utilisent le fibrinogène et se servent plus exactement de la fibrinolyse. Parmi les techniques faisant appel à la fibrinolyse pour étudier l'activité protéolytique, nous avons choisi la plaque de fibrine standard.

Celle-ci présente deux inconvénients qui l'ont fait abandonner par beaucoup d'auteurs :

- Nos plaques sont préparées à partir de fibrinogène de boeuf, qui nous le savons, contient des quantités non négligeables de plsminogène. La méthode ne permet donc pas de distinguer ce qui dans la lyse appartient à la plasmine de ce

qui revient aux activateurs du plasminogène.

- Certains auteurs comme de VRIES, BRAAT, Van STRAATEN MULLER et WETTERMARK, signalent que le fibrinogène bovin tel qu'il est préparé, contient également de l'antiplasmine. De ce fait, la méthode ne permet pas de mettre en évidence une déficience en ce facteur.

LASSEN (1952) chauffe la plaque à 80° pendant 45 mn, pour dénaturer le plasminogène. Ce traitement d'après MULLERTZ détruirait également l'antiplasmine.

Toutefois cette modification apportée à la méthode standard, s'est révélée pour nous longue, peu commode et ne pouvant pas être employée dans un dosage de routine.

Notre but, n'est que d'observer le résultat global de la protéolyse, sans entrer dans le détail de l'interaction des divers facteurs intervenant dans la fibrinolyse.

C.- LES EUGLOBULINES DU PLASMA

1°) - Récolte du sang pour la préparation des euglobulines du plasma

Elle se fait en même temps que celle du sang destiné au concentré leucocytaire, mais le prélèvement se fait sur mélange anticoagulant de Wintrobe.

Préparation du Wintrobe :

Oxalate d'ammonium	1,2 g
Oxalate de potassium	0,8 g
Eau distillée	100 cm^3

L'ensemble est réparti dans des flacons de 10 cm^3 : à raison de 1 cm^3 par flacon. Ceux-ci sont portés à l'étuve à 100° jusqu'à dessication de leur contenu, qui se présente alors sous forme de petits cristaux blancs. Les flacons sont gardés à la température du laboratoire sans précaution spéciale.

1 cm^3 d'anticoagulant sert pour 9 cm^3 de sang.

On prélève donc environ 9 cm^3 de sang. On bouche le flacon et on agite vigoureusement.

Le plus rapidement possible ce sang est centrifugé à 4000 tours/mn pendant 10 mn, et on en recueille le plasma qui sera tout de suite utilisé pour donner les euglobulines.

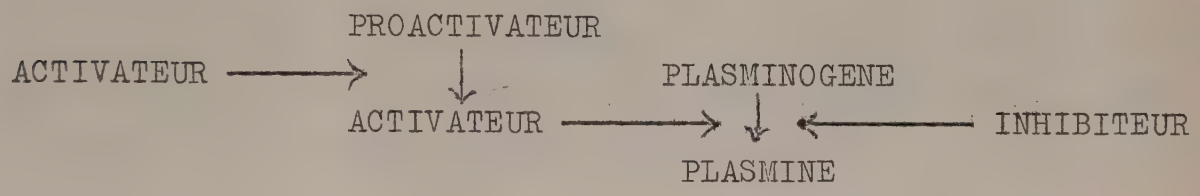
2°) - Précipitation des euglobulines du plasma

But de ma méthode

Elle vise à pouvoir étudier la fibrinolyse provoquée par les activateurs du plasminogène séparés des inhibiteurs qui les accompagnent dans tout plasma d'un sujet étudié.

D'après ASTRUP en effet, la fibrinolyse peut se schématiser de la manière suivante :

Schéma d'après ASTRUP (1956)



LANDSTEINER (1900) donne pour certain, que le sérum possède une activité antitrypsique et que celle-ci ne se retrouve pas dans sa fraction globulinique.

HEDIN (1904) affirme que l'activité fibrinolytique d'un sérum, réside dans sa fraction euglobulique, l'enzyme en cause étant identique à celle sécrétée par les leucocytes.

OPIE et BARKER (1907) parviennent aux mêmes conclusions.

SHERRY,LINDMEYRE,FLETCHER et ALKJAERSIG (1958) sont à notre connaissance les premiers à avoir utilisé cette propriété des euglobulines pour l'étude de l'activité fibrinolytique d'un plasma. C'est de leur méthode de préparation que nous nous sommes servis.

a) - Principe de la méthode

Les euglobulines du plasma, représentent la fraction protéinique qui précipite à une concentration ionique suffisamment basse, lorsqu'on la porte à son pH isoélectrique. (D'après ENSELME et DREYFUS).

b) - Méthode employée

Nous avons précipité les euglobulines par la méthode de MILSTONE, reprise par SHERRY, LINDMEYER, FLETCHER et ALKJAERSIG.

1) - Précipitation des euglobulines

Elle se fait, par l'intermédiaire d'une solution composée comme suit : 19 volumes d'eau distillée et neutralisée, contiennent 0,32 volumes d'acide acétique à 1 %.

0,5 cm^3 de plasma sont pipetés dans un tube à centrifuger à fond arrondi.

9,5 cm^3 de solution acétique sont ajoutés. Il se forme immédiatement un précipité laiteux. On retourne plusieurs fois le tube, pour bien mélanger.

2) - Centrifugation

Elle se fait pendant 15 mn, à la vitesse de 4.000 tours/mn. Les euglobulines tapissent alors le fond du tube, en une couche blanche, plus ou moins épaisse suivant le plasma utilisé. Le surnageant doit être parfaitement limpide, sinon il faut recentrifuger.

On jette le surnageant, et on laisse égouter le tube

retourné sur un papier filtre. Puis on sèche les parois intérieures du tube avec un papier filtre.

3) - Resuspension des euglobulines

Elle se fait avec une solution tampon de Michaelis à 0,01 M et pH 7,4.

Formule du Michaelis :	à pH 7,4	
	HCl M/10	419 cm^3
véronal sodique	M/10	581 cm^3

On reprend les euglobulines par 0,1 cm^3 du tampon, en les décollant soigneusement du fond avec une baguette de verre. C'est cette suspension, qui donc est concentrée cinq fois par rapport au plasma, que nous utilisons pour tester l'activité protéolytique du plasma.

D.- MISE SUR PLAQUE DE FIBRINE DU CONCENTRE LEUCOCYTAIRE

0,03 cm^3 de concentré, à environ 10^6 leucocytes par mm^3 est déposé sur une plaque de fibrine à l'aide d'une pipette graduée. Le concentré étant très épais, il faut souffler la goutte, en prenant soin d'éviter les bulles d'air.

En parallèle avec le concentré leucocytaire du sujet à étudier, nous mettons toujours sur la même plaque 0,03 cm^3 de concentré provenant d'un sujet sain : celui-ci nous servira de témoin.

Lorsque la concentration, et nous avons observé le cas chez des malades dont la leucocytose était très élevée, atteint ou dépasse le double de la normale, nous procédons de la manière suivante :

Plutôt que de diluer le concentré, ce qui, nous le verrons risquerait de fausser considérablement les résultats, nous employons simplement pour nos expériences des quantités moindres de concentré, calculées en fonction du chiffre trouvé dans la numération.

E.- MISE SUR PLAQUE DE LA SUSPENSION D'EUGLOBULINES

Elle se fait exactement de la même manière, en prenant 0,03 cm^3 d'euglobulines suspendues dans 0,1 cm^3 de Michaelis. Le seul obstacle que nous ayons rencontré, réside dans le facteur temps : les euglobulines doivent être mises sur plaque dans la demi-heure qui suit le prélèvement de sang. Passé ce

délai, lorsqu'on les reprend par la solution tampon il se forme un caillot.

La boîte de Pétri contenant notre plaque de fibrine, est ensuite couverte et portée à l'étuve à 37° jusqu'au lendemain.

F.- LECTURE DES RESULTATS

Pour des raisons pratiques, nous faisons nos lectures de 20 à 22 hres après la mise à l'étuve. En fait le maximum de fibrinolyse est obtenu au bout de 18 heures. Après 26 à 30 heures par contre, la plaque subit une autolyse progressive.

A ce moment, nous enlevons de la plaque notre goutte de concentré leucocytaire, à l'aide d'un papier filtre. Nous calculons la surface de lyse d'après la moyenne de trois diamètres, mesurés au moyen d'un compas à pointes sèches. Le résultat est donné en mm^2.

Nous avons conventionnellement adopté la valeur de 1 mm^2 pour désigner le cas où la lyse ne fait que toucher le fond de la plaque de fibrine.

La lecture du résultat obtenu en partant des euglobulines se fait exactement de la même manière, mis à part qu'il n'est besoin que de faire les mesures sans autres préliminaires.

G.- TECHNIQUES DIVERSES

a) Formule différentielle
b) Numération des leucocytes
c) Numération des hématies
d) Dosage de l'hémoglobine

Nous nous sommes servi des techniques habituelles.

H.- NUMERATION DES PLAQUETTES

Principe :

On compte les plaquettes, après les avoir dilué dans une solution, qui outre qu'elle lyse les hématies, entrave l'agglutination des plaquettes, leur accolement au verre et leur désintégration.

Matériel :

Pipette à globules blancs
Solution de cocaïne :

Chlorhydrate de cocaïne	3 g
ClNa	0,2 g
Eau distillée	100 cm^3

Technique :

On procède à une dilution au 1/10 comme pour les leucocytes.

On agite pendant 3 à 5 mn.

La numération se fait sur cellule de Thoma. Il faut laisser les plaquettes sous lame pendant 10 mn, avant de faire la lecture.

I.- TECHNIQUE DES EUGLOBULINES EN TUBE

Elle consiste à mesurer le temps de lyse à 37°, des euglobulines resuspendues dans un tampon et coagulées par de la thrombine.

Matériel

- Solution tampon de Michaelis 0,01 M pH 7,4
- Solution de thrombine Roche à 2 U NIH/cm^3
- Euglobulines précipitées à partir de 0,5 cm^3 de plasma.

Méthode

Les euglobulines sont resuspendues dans 0,5 cm^3 de Michaelis et le tout est versé dans un tube à hémolyse. On porte au bain-marie. A ce moment, on coagule le système en soufflant dans le tube 0,5 cm^3 de solution de thrombine à 2 U/cm^3. On déclenche le chronomètre.

Résultats

Chez le sujet normal, le temps de lyse du caillot ainsi obtenu, varie entre 3 h et 20 h.

Nous considérons donc qu'un temps de 3 heures constitue la limite de la normale.

En pathologie, nous avons pu observer des temps raccourcis jusqu'à 37 mn.

- Chapitre II -

RESULTATS CHEZ LE SUJET NORMAL

Nous avons réalisé une première série d'expériences, avec du sang provenant de sujets apparemment sains, pris au hasard parmi les donneurs de sang du Centre de Transfusion, sans aucune considération d'âge, de constitution ou d'antécédents pathologiques.

A.- RESULTATS

N°	Nombre de G.B./mm^3 x 10^6	Surface de lyse en mm^2
1	0,95	15
2	1,20	0
3		12
4		40
5	1,10	1
6	1,06	1
7	0,90	15
8	1,40	15
9	1,20	1
10	1,12	1
11	0,95	27
12	1,10	15
13	1,20	20
14		0
15		10

B.- DISCUSSION

Nous observons chez le sujet normal des variations assez importantes, puisqu'elles vont de 0 à 27 mm^2 (nous éliminons la valeur extrême de 40 mm^2, d'une part parce qu'elle est isolée, d'autre part parce qu'elle n'a pas pu être vérifiée chez ce sujet).

Nous avons dans un deuxième temps essayé de voir, d'où peut provenir cette grande variabilité dans la fibrinolyse.

FACTEURS POUVANT INTERVENIR

a) Variations dues au matériel d'expérience

1) - Influence du lot de fibrinogène
2) - Variations dues à la plaque elle-même : il s'agirait de voir si d'une plaque à l'autre, nous avons une sensibilité différente à l'action fibrinolytique.
3) - Influence du facteur temps : temps écoulé entre le prélèvement et la mise sur plaque.
4) - Influence de la quantité de leucocytes mise sur plaque.

b) Variations suivant les individus

1) - Celle qui serait due à l'activité inhibitrice du plasma
2) - Choix d'un sujet type
3) - Sensibilité plus grande de certaines leucocytes à l'action du liquide hémolysant.

a) Variations dues au matériel d'expérience

1) - Influence du lot de fibrinogène

Nous nous sommes servis de trois lots successifs de fibrinogène. Les variations observées d'un lot à un autre sont les mêmes que celles observées à l'intérieur de chaque lot.

2) - Variations dues à la plaque elle-même

La quantité de solution de fibrinogène coulée dans une boîte de Petri est mesurée assez grossièrement, de même que la quantité de solution de thrombine.

Mais nous avons à de multiples reprises, testé sur une même plaque de fibrine, les concentrés leucocytaires provenant de 2 ou 3 sujets : les variations dans la lyse sont les mêmes que celles observées sur des plaques différentes.

3) - Influence du facteur temps

Pour les euglobulines sur plaque, comme nous l'avons signalé dans la méthode, la rapidité d'intervention joue un rôle important du fait que les euglobulines resuspendues coagulent passé 1 heure après le prélèvement.

Un phénomène équivalent peut-il intervenir pour le concentré leucocytaire? Pour le savoir, nous avons testé, chez un même sujet, son activité fibrinolytique au deux temps limites ou il peut nous être donné de la tester dans les conditions de notre expérimentation : 1/2 heure après le prélèvement de sang et 4 heures après. Voici les résultats obtenus :

	Lyse du concentré leucocytaire en mm^2	
	Sang utilisé dans la 1/2 heure	Sang utilisé après 4 hre à la température du Laboratoire
Témoins I	12	12
2	1	1
3	12	10
Malades I Rie;	3	3
2 Hub.	0	0

Il ne semble donc pas que dans les limites de nos expériences, le temps puisse intervenir. Nous avons simplement remarqué à ce sujet qu'au bout de 4 heures, le concentré passe plus difficilement au travers de la pipette.

4) - Influence de la quantité absolue de leucocytes déposés sur la plaque

Nous déposons comme il a été dit plus haut, 0,03 cm^3 de concentré leucocytaire sur la plaque pour chaque sujet étudié.

Or le nombre de leucocytes/mm^3 varie entre $0,95 \times 10^6$ et $1,20 \times 10^6$. En valeur absolue, le nombre de leucocytes mis sur plaque varie donc d'un sujet à l'autre.

Mais il suffit de consulter le tableau pour voir qu'il n'existe pas de relation entre ce nombre et la lyse obtenue. Ceci n'est vrai que dans les limites de nos expériences.

Chez deux malades ayant un concentré leucocytaire très important, nous avons eu ces résultats :

Nom	Leuco/mm 3 x 10^6	0,03 conc.	0,06 conc.
KEL.	1,2	10	50
HUB.	1,09	1	1

La quantité de leucocytes joue donc incontestablement comme on devait s'y attendre, mais dans nos expériences, la cause d'erreur résultant de l'approximation de ce chiffre est négligeable.

b) - Variations individuelles

1) Celles qui seraient imputables à l'activité inhibitrice de la fraction $\alpha_1 - \alpha_2$ du plasma.

- Dans un tube cônique tel qu'il se présente après centrifugation, le plasma se trouve être dilué environ 40 fois dans le surnageant.
- Les leucocytes par contre se trouvent très concentrés : environ 100 x. L'hypothèse semble dès lors assez invraisemblable.

Nous avons néanmoins à deux reprises testé en parallèle : d'une part le concentré tel que nous l'avons toujours pris d'autre part, le concentré provenant du même sang, mais dont nous avons rejeté le surnageant, remplacé ce surnageant par de la saline, et que nous avons recentrifugé pendant quelques minutes.

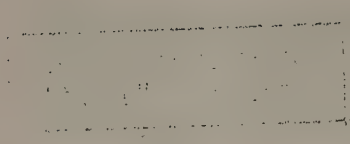
	Concentré leucocytaire "non lavé"	Concentré leucocytaire "lavé"
1	12 mm^2	12 mm^2
2	15 mm^2	17 mm^2

2) Rôle des caractéristiques

Une deuxième série d'expérience a été faite à partir du sang de sujets que nous avons sélectionnés parmi ces mêmes donneurs de sang : des hommes de la trentaine, de corpulence moyenne, n'ayant pas fait d'exercice violent dans les heures précédant le prélèvement, n'ayant dans leurs antécédents aucune maladie, et qui par surcroît ne soient pas des donneurs "habituels".

Résultats

N°	Nbre de G.B./mm^3 x 10^6	Surface de lyse en mm^2
16		15
17		0
18		1
19		0
20		20
21		20
22		0
23		1
24		25
25		1
26		0
27		15
28		0
29		0
30		1
31		20



Les valeurs maxima et minima de fibrinolyse que nous avons observées, présentent entre elles le même écart que dans notre première série d'expériences où les sujets étaient pris au hasard. Dans la limite de nos résultats, nous pouvons donc conclure à deux choses :

- Il ne paraît pas nécessaire d'attacher une importance au choix du sujet témoin.

- Dans les cas pathologiques que nous envisageons d'étudier les variations éventuelles sortant des limites de la normale, pourront être attribuées au processus morbide.

3) - Sensibilité plus grande de certains leucocytes à l'action du liquide hémolysant

Dans la technique de leucoconcentration, HERBEUVAL précise que pour que les leucocytes ne soient pas altérés, à leur tour, il faut leur ajouter du liquide conservateur au moment précis où l'hémolyse des globules rouges vient de se produire.

Nous avons fait l'expérience suivante :

Avec le sang d'un même sujet, nous préparons d'une part un concentré leucocytaire selon la technique habituelle, d'autre part un concentré où l'hémolyse a été poussée à quelques gouttes au-delà de l'hémolyse totale des globules rouges, en dernier lieu un concentré pour lequel nous avons franchement doublé la quantité nécessaire à l'hémolyse.

Résultats

Conc. habituel	Conc. peu hyper-hémolysé	Conc. hyper-hémolysé
12 mm^2 10 mm^2	15 mm^2 11 mm^2	110 mm^2 115 mm^2

Le virage de couleur du mélange sang-liquide conservateur de la technique est très net au moment où l'hémolyse des globules rouges prend fin. Comme d'autre part à quelques gouttes près, la variation dans la fibrinolyse observée est pour ainsi dire nulle, nous pouvons dire que l'erreur due à l'appréciation de l'opérateur est négligeable.

Dans le cas où l'hémolyse est poussée trop loin, nous pouvons admettre que, les leucocytes étant profondément altérés, ils libèrent de ce fait leur protéases.

Cette hypothèse est encore confirmée par les expériences suivantes :

Chez un même sujet, nous avons prélevé dans trois séries de tubes :

- une série nous a servie de témoin : le concentré leucocytaire a été préparé selon la technique habituelle
- dans une deuxième série de tubes, nous avons rejeté le surnageant, nous l'avons remplacé par de la saline comme déjà précédemment, mais de plus nous avons soigneusement agité à la micropipette pour faire le mélange, puis nous avons recentrifugé pendant 15 mn à 4.000 tours/mn.
- dans la troisième série de tubes enfin, nous avons procédé de la même manière en remplaçant la saline par de l'eau distillée.

Résultats

Série I	Série II	Série III
12 mm^2	27 mm^2	254 mm^2
15 mm^2	113 mm^2	250 mm^2
15 mm^2	94 mm^2	230 mm^2
12 mm^2		210 mm^2

Les leucocytes ainsi traités sont morphologiquement très altérés :

- En saline les noyaux des leucocytes apparaissent gonflés, boudinés, beaucoup sont isolés (surtout de lymphocytes)

- En eau distillée ces noyaux sont rétractés et encore beaucoup plus nombreux sous forme isolée.

C.- CONCLUSION

Chez le sujet normal, le concentré de leucocytes tel qu'il est préparé selon la technique d'HERBEUVAL, peut présenter une activité fibrinolytique.

- Cette activité est variable suivant les sujets.
- Plus les leucocytes sont détériorés, et plus ils libèrent leurs enzymes protéolytiques.
- Etant donné que le liquide hémolytique à forte dose, se montre capable de détériorer les leucocytes, on ne peut pas à priori éliminer l'hypothèse selon laquelle, les variations individuelles entre sujets normaux, exprimeraient surtout une sensiblité plus ou moins grande suivant le sujet, au liquide hémolysant, en pourcentage plus ou moins important de leucocytes fragilisés.

- Chapitre III -

RESULTATS DANS QUELQUES CAS D'HEMOPATHIES

Les premiers résultats obtenus en partant de concentrés leucocytaires provenant de malades atteints d'hémopathies, nous ont frappés par leurs variations, beaucoup plus considérables que chez le sujet normal.

Nous avons procédé de la façon suivante :

En même temps que nous avons testé les concentrés leucocytaires de nos malades - et dans la mesure du possible, l'activité protéolytique des euglobulines du plasma -, nous avons noté le maximum de renseignements hématologiques et cliniques. Nous avons finalement retenu pour chaque cas :

- l'âge du sujet
- l'affection en cause
- la numération sanguine
- la formule sanguine
- les éventuels troubles de l'hémostase
- l'aspect de la leucoconcentration, sur des lames faites à partir du même concentré leucocytaire et si possible l'image de la moelle osseuse.

Les investigations cliniques ont été faites le même jour que nos expériences, ce qui pourrait avoir une certaine importance étant donné, que d'un jour à l'autre, elles peuvent donner des résultats très différents.

Nous avons mis ces renseignements en parallèle avec nos résultats, et résumé le tout dans un tableau, en classant

N°	Noms	Age	Diagnostic	Plaques de fibrine culot leucocytaire	euglobulines	Leucocytes concentré	leucocytose
				en mm²	en mm²	x 10,6	x 10,3
1	D..R.	66	leucose à promyélocytes	400 (15) 379 (10)	./.	1,2	21,6
2	K..E.	57	polycythémie	113	./.	0,9	7,6
3	K..J.	42	polycythémie	110 (1)	80 (50)	0,95	2,7
4	M..A.	60	néoplasme bronchique	145 (0)	./.	-	6,2
5	L..A.	66	lymphose	./.	113 (50)	1,2	22,2
6	S..E.	62	lymphose	38 (1) 104 (10)	en tube 60mn 104 (40)	1,2 1,2	19,2
7	G..A.	27	M. Hodgkin	50 (0) 111 (10)	- 50 (40)	1,1 1,3	10,0
8	R..L.		polycythémie	50	80 (50) 1 h 30	1,09	7,40
9	M..A.	49	polyglobulie	35	112 (40 1 h 30		6,08
10	W..L.	52	lymphose	57 (0)	-	1,06	6,4
11	H..C.	66	lymphose chronique	75 (1) 35 (5)	- -	1,0 1,1	130,8 -
12	K..R.	16	lymphose aiguë	502 (10)	en tube 37mn (3 h)	1,2	9,2
13	Th.M.	67	lymphose	80 (10)	50 (40)	1,8	54,4
14	V.J.P.	63	polycythémie	19 (0)	-	1,1	9,2
15	M..A.	42	polycythémie	15 (0)	-	-	6,2

Forme différentielle						Hématies	Hb%	Plaquettes x 10^3	Hémostase
N	E	B	L	M	Formes anormales				
48	0	0	33	1	Myc 4 Myb 10 pMyc 4	2,25	46	37,6	T.S. 4' T.C. 10'30 F.I. 6g20
83	1	1	13	2		7,15	93	410,4	
77	0	0	15	8		5,62	122	87,2	
91	0	0	4	5		4,21	87	133,6	
11	3	0	83	1	pL 2	4,24	82	200,0	
-	-	-	-	-		-	-	-	
16	0	0	81	2	pL 1 rar. ombres de Gumbrecht	4,36	90	-	
94	0	0	4	2					
-	-	-	-	-		2,92	49	423,6	
84	2	1	13	-		7,29	120	101,4	
52	4	-	44			5,80	110	120,0	
48	0	3	44	5	rares ombres de Gumbrecht	4,36	96	-	
10	0	0	97,5	0	pL 2,5				
200			200			3,78	84	164,0	
-	-	-	-	-					
3	0	0	91	0	pL 6 ombres de Gumbr.	1,98	40	268,8	T.S. 1'30 T.C. 7'30 F.I. 3g5
4	1	0	91	0		3,74	72	-	
-	-	-	-	-		7,14	140	-	
69	7	5	18	1		7,78	139	293,6	T.S. 1' T.C. 9'

N°	Noms	Age	Diagnostic	Plaques de fibrine culot leucocytaire en mm^2	euglobulines en mm^2	Leucocytes concentré x 10,6	leucocytose x 10,3
16	R..E.	62	polycythémie	28 (0)	94 (0)	1,0	13,9
17	B..P.	54	polycythémie	20 (0)	50 (50)	0,98	6,2
18	F..F.	61	polycythémie	28 (0)	-	1,0	3,8
19	S..J.	61	polycythémie	19,5(1)	94 (50)	1,0	4,0
20	T..M.	73	lymphose chronique	20 (1)	-	1,5	26,4
21	B..J.	70	lymphose chronique	28 (1)	-	1,1	27,8
22	B..F.	21	pancytopénie	20 (1)	60 (50)	1,0	0,6
23	M..H.	49	myélose	28 (13)	50 (50)	1,1	109,3
24	H..R.	37	mélosclérose splénectomie	10 (1)	20 (40)	1,24	278,0
25	K..C.	12	mononucléose infectieuse	20 (12)	14 (40)	1,0	3,5
26	B..M.	56	polycythémie	0	-	0,9088	8,2
27	N..M.	61	Lymphose subleucémique	12 (11)	-	1,5	12,6

Forme différentielle						Hématies	Hb%	Plaquettes x 10^3	Hémostase
N	E	B	L	M	Formes anormales				
72	1	1	19	6	Myc 1	5,38	122	-	
75	0	0	17	8		5,58	130	-	
83	1	0	11	5		7,32	120	394	
73	1	6	13	1	pMyc 3 mMyc 3	3,56	75	-	
19	0	1	69	2	Lb 9 ombre de Gumbrecht 68 %	4,3	81	263,2	
2	1	0	96	1	L à tendance P 1 ombre de Gumbrecht	3,2	68	91,2	T.S. 2'30 T.C.10'30
25/50	0	0	14/50	0	Myc 9 pMyc 1 Myb 1	1,43	28	87,2	
55	3	8,5	0	2,5	mMyc N 7 Myc N 13,5 pMyc 5,5 Myb 4 Myc E 1	3,3	66	87,2	T.S.2'30 T.C.9'30 F.I 2,20
85	5	0	5	2	Myc N 3	3,3	71	1,556	
8	0	0	86	3	pL 3 ombre de Gumbrecht 62 %	4,39	80	-	T.S. 2' T.C.11' F.I. 3,20
71	8	1	14	6		5,83	140	-	
20	2	2	61	4	pMyc N 1 pMyc 10 ombre de Gumbrecht 62 %	39,8	88	162,4	

N°	Noms	Age	Diagnostic	Plaques de fibrine culot leucocytaire en mm²	Plaques de fibrine euglobulines en mm²	Leucocytes concentré x 10,6	Leucocytes leucocytose x 10,³
28	S..C.	59	polycythémie	1	-	1,08	9,2
29	N..E.	67	polycythémie	1	-	0,88	2,4
30	Z..S.	53	myélosclérose polycythémique	1 (1)	-	1,1	37,0
31	H..E.	46	myélosclérose	0 (0)	-	1,09	25,8
32	M..E.	65	sarcome lymphoblastique	1 (1)	12 (20)	1,02	1,05
33	R..M.	74	Lymphose	3 (0)	30 (10)	1,3	79,4
34	H..A.	59	Myélose	0 (5) 1 (1)	50 (50) -	0,95 1,24	12,6 -
35	P..L.	40	Myélose	0 (0)	en tube 3 h(3h)	1,17	27,6
36	V..M.	35	Myélose	0 (0)	en tube 5 h	1,1	24,7
37	S..G.		Myélose	12 (11)	50 (40)	1,1	3,7
38	B..E.		Myélose aiguë	0 (0)	50 (50)	1,4	70,8

Forme différentielle						Hématies	Hb%	Plaquettes x 10^3	Hémostase
N	E	B	L	M	Formes anormales				
82	4	3	5	6		6,02	112	-	
42	3	0	42	11	Myc 2	5,04	126	163,2	
59	2	6	8	-	mMyc N 2 Myc N 19 pMyc 1 blastes 3	5,65	80	64,0	
71	5	1	17	5		8,4	131	468,0	T.S. 1'30 T.C.10'30 PTB. 92%
76	0	1	16	7		4,06	84	-	
4	0	0	95	0	pL 1 ombre de Gumbrecht 27 %	3,08	75	124,4	
45	0	21	7	3	mMyc N 17 Myc N 7	3,76	80	33,6	
65,5	6,5	9,5	2	2	mMyc N 7,5 Myc N 5,5 mMyc E 0,5 Myc E 2 Myb 1	4,9	90	1197,0	
64	3	10	0	1	mMyc N 7 Myc N 9 pMyc 2	4,12	78	690,0	
61	5	6	11	17		4,45	87	178,0	
3	0	0	5	0	P 1 mMyc N 1 Myc N 1 pMyc 1 Myb 88	2,33	49	79,2	T.S. 1'30 T.C.12'

N°	Noms	Age	Diagnostic	Plaques de fibrine culot leucocytaire en mm^2	euglobulines en mm^2	Leucocytes concentré x 10,6	leucocytose x 10,3
39	R..A.		Myélose chronique	0 (15)	-	1,0	15,
40	C..R.		Réticulose histiomonocytaire	0 (1)	78 (50)	1,1	1,

Légende des abréviations

N : polynucléaire neutrophile
E : " eosinophile
B : " basophile
L : lymphocyte
M : monocyte
P : plasmocyte

Myc : myélocyte
mMyc : métamyélocyte
pMyc : promyélocyte
Myb : myéloblaste
pL : prolymphocyte
Myc N: myélocyte neutrophile
mMyc N : métamyélocyte neutrophile

Forme différentielle						Hématies	Hb%	Plaquettes x 10^3	Hémostase
N	E	B	L	M	Formes anormales				
14	0	0	19	0	P 1 Myc N 0,5 Myb 58 Blastes 7,5	3,07	73	32,0	T.S. 3' T.C.17'
5	0	1	51	16	pMyc 1 Myb 8 cell.mono-cytaire 18	4,7	91	212,0	T.S. 1' T.C. 4'

suivant la valeur décroissante de la fibrinolyse.

Résultats

Ils portent en tout sur 40 cas pouvant être classés comme suit :

- 13 Polycythémies
- 10 Lymphoses
- 7 Myéloses
- 3 Myélosclérosses
- 1 Sarcome lymphoblastique
- 1 Pancytopénie
- 1 Lymphogranulomatose
- 1 Réticulose
- 1 Mononucléose infectieuse
- 1 Néoplasme bronchique
- 1 Leucose à promyélocytes

En regardant ce tableau, on ne trouve à priori rien de commun, entre des malades possédant une activité fibrinolytique équivalente. Nous allons voir successivement les différents cas:

Leucose à promyélocytes

Nous en avons eu un seul cas. Nous avons retrouvé de façon incontestable, l'augmentation de l'activité fibrinolytique classiquement écrite dans cette affection, encore que celle-ci ait été contestée tout récemment comme nous l'avons écrit plus haut.

Nous avons pu suivre ce malade pendant plusieurs mois et renouveler nos expériences.

Il ne nous a pas été possible de tester l'activité pro-

téolytique sur plaque des euglobines : resuspendues en Michaelis, elles coagulent.

Voici les résultats successivement obtenus avec le concentré leucocytaire :

Lyse en mm^2

379 (témoin 15)
200 (témoin 10)
260 (témoin 27)

Maladie de Hodgkin

Nous n'en avons également observé qu'un seul cas. L'activité fibrinolytique du concentré leucocytaire, testée à deux reprises s'est vérifiée considérablement augmentée. L'activité protéolytique des euglobines par contre n'est que modérément augmentée.

Conc. leucocytaire	Euglobulines
50 (0)	-----
III (10)	50 (40)

Polycythémies

N°	Conc. leuc. mm^2	Euglobines mm^2	Nbre d'érythro/mm^3 x 10^6
1	113		7,15
2	110	80	5,62
3	50	80 (50)	7,29
4	35	112 (40)	5,80
5	28	94 (50)	7,74
6	28		5,58
7	20	50 (50)	5,38
8	19	94 (50)	7,14
9	19		7,56
10	15		7,78
11	12		5,04
12	1		6,02
13	1		5,83

Quelques remarques s'imposent

Dans un quart des cas, nous avons une augmentation très nette de l'activité fibrinolytique du concentré leucocytaire. Dans la moitié des cas, elle est à la limite supérieure de la normale.

D'autre part, chez les malades où elle a pu être testée, l'activité protéolytique des euglobines du plasma se trouve également sensiblement augmentée, sans que l'on puisse toutefois établir un parallélisme rigoureux ou même franc entre les deux séries de valeurs.

1) - Intervention de l'hyperhémolyse

Pour parvenir à l'hémolyse totale des érythrocytes dans les polycythémies, il faut une quantité de liquide hémolysant notablement supérieure à celle nécessaire chez le sujet normal. Il nous semble que, outre le nombre plus élevé d'érythrocytes, il intervient une sensibilité moins grande à l'hémolyse : il nous est arrivé, de devoir employer dans des cas de polycythémi modérée, des quantités de liquide hémolysant doubles de la normale.

Une première hypothèse donc pour expliquer cette augmentation de l'activité protéolytique : les leucocytes seraient altérés par le liquide hémolysant.

2) - Fragilité des leucocytes due à d'autres facteurs

Cette hypothèse est étayée par le fait de l'augmentation de la protéolyse provoquée par les euglobulines; (en admettant que l'activité protéolytique du plasma prenne son origine dans les enzymes libérées par la destruction des leucocytes).

Lymphoses

N°	Conc. Leucocyt. mm^2	Euglobuline mm^2
1		104
2	104	113
3	57	
4	75	
5	50	en tube 37 mn
6	80	50
7	20	
8	28	
9	12	
10	3	30

La moitié des résultats sont franchement positifs. Ceci pourrait résulter de la fragilité des lymphocytes surtout pathologiques. On note sur les étalements de sang faits chez ces malades, la présence d'ombres de Gumbrecht qui attestent cette fragilité des lymphocytes, qui peuvent par là même, libérer leurs enzymes protéolytiques.

Affections diverses

Par contre, dans 7 cas de myélose, 3 cas de myélosclérose, 1 réticulose, 1 pancytopénie, 1 mononucléose infectieuse, aucune différence d'activité fibrinolytique n'a été constatée, par rapport au sujet normal.

- Chapitre IV -

EVOLUTION DE LA FIBRINOLYSE CHEZ UN IEME SUJET

Nous avons pu revoir six parmi les malades étudiés, à un autre stade de leur évolution clinique, et il nous a paru intéressant, de renouveler nos expériences.

Nous avons réuni nos résultats dans un tableau, avec dans le même temps, les renseignements fournis par l'hématologie, et un très bref résumé de l'histoire clinique :

DISCUSSION

1) - Dans le cas de polycythémie, à l'augmentation de l'activité fibrinolytique, correspond une aggravation hématologique et clinique pour la malade.

2) - Dans la leucose à promyélocytes, la fibrinolyse se maintient très élevée. L'hématologie voit apparaître en plus forte proportion des formes cellulaires immatures; l'état clinique se maintient.

3) - Dans la leucose myéloïde, à aucun moment nous n'avons observé d'activité fibrinolytique, ni pour le concentré de leucocytes, ni pour les euglobulines du plasma. L'évolution clinique n'a eu aucune traduction en fibrinolyse, pas plus que

EVOLUTION DE LA FIBRINOLYSE

Noms Age Sexe	Date 1963	Résultats Expérimentaux Plaque de fibrine Conc. leucocytaire	 euglob. d. plasma	Leucocytes Conc. x 10^6	 Leucocytose x 10^3	Hématologie Formule différenti N	E	B	L	M
K..J.	3.5	7 (0)	-	0,95	2,7	77	-	-	15	8
F. 42 ans polycythémie	17.5	110 (1)	80	1,10	4,0	74	-	1	19	6
	7.6	20 (1)	28	1,10	3,2	68	1	1	25	4
D..R.	7.3	400 (15)	-	1,2	9,1	60	-	1	32	-
H. 66 ans Leucose à promyélocytes	18.3	379 (10)	-	1,1	8,0	41	-	-	46	-
	22.4	200 (1)	2 h en tube	1,1	6,4	50	-	-	27	-
H..A.	3.5	0 (0)	50	0,95	12,6	35	-	21	7	3
H. 66 ans Leucose myéloïde	29.5	1	50	1,24	276	35	1	5	0,5	7,
H..Ca F. 66 ans Lymphose	22.3	75 (1)	-	1,00	217	5	-	-	95	-
		19 (5)	-	1,10	37,8	10	-	-	87,5	-
G..R. H. 27 ans Hodgkin	26.4	50 (0)	-	1,10	10,0	94	-	-	4	2
	19.6	110	50	1,30	10,4	90	-	-	8	-
S..E. H. 42 ans Lymphose	9.5	38		1,2	19,2	16	-	-	81	2
	19.6	104 (20)	104	1,2	42,3	7	-	-	90	2

CHEZ UN MEME SUJET

HEMATOLOGIE				CLINIQUE
Formes anormales	Hématies x 10^6	Hb %	Plaquettes x 10^3	
	5,62	122	87,2	Malade suivie depuis mars 63 Traitée au phosphate de chrome en mars. Entre le 3.5. et le 17.5.accentuation des troubles subjectifs : vertiges, céphalée précordialgies.
	7,00	138	59,0	
	6,60	136	82,6	
mMyc N 12 Myc N 2 Myb 2 Macro 2 pL 1 P 1	2,06	47	21	Leucose découverte à la suite d'un examen systématique après intervention sur néoplasme du rectum en décemblre 62. L'état clinique demeure stationnairc pdt le temps de nos expériences
	3,12	62	40	
	4,48	99	18	
mMyc 7) Myc 17)	3,76	80	-	En traitement depuis août 61. Tous les 6 mois environ (phosphate de chrome)le dernier remonte à mars 63. Subitement au mois de mai fléchissement de l'état général.
Myc 6 mMyc 6,5 pMyc 28 Myb 10,5	3,06	64		
-	-	-	-	La maladie apparente débute en décembre 62:fièvre, amaigrisst Le diagnostic est fait en mars 63.Splénomégalie importante. Entre les 2 prélèvts traitt au phosphate de chrome en avril 63 A la suite état général très amélioré.
pL 2,5	3,78	84	-	
	2,92	49	423,0	Malade traité depuis févr.60 joue un syndrome néphrotique.En sept. 62, épanchemt pleural et adénopathies multiples. Malade traité à plus.reprises par télé cobalt.Aggravation progressive.
mMyc N 1) Myc N 1)	4,06	90	98,4	
pL 1	-	90	-	Diagnostic établi en juin 59 à la suite de précordialgies et de manif. bronchiques. Importts adénopathies médiastinales.Aggravation nette entre les 2prélèvts.Malade réhospitalisé pour nouvelle poussée de son affect.
pL 1	-	-	60,4	

le passage dans le sang circulant de formes cellulaires jeunes. Cette dernière remarque est valable pour l'ensemble des cas que nous avons pu étudier et le tableau a permis de le mettre en évidence.

4) - Dans les deux cas de lymphose, nous notons dans l'un des cas une chute de la leucocytose, une amélioration de l'état clinique et une baisse de l'activité fibrinolytique, dans l'autre une poussée aiguë attestée par l'examen hématologique et clinique et qui se traduit pour nous par une augmentation importante de l'activité fibrinolytique.

5) - Dans le cas de maladie de Hodgkin, nous voyons une leucocytose avec polynucléose persistante et une importante chute des plaquettes. L'état clinique s'aggrave lentement. La fibrinolyse a notablement augmenté.

Conclusion :

Ces quelques cas montrent clairement, que, si l'activité fibrinolytique d'un concentré de leucocytes évolue en même temps que les signes hématologiques et cliniques.

- C O N C L U S I O N S -

1°) - Chez le sujet normal

Un concentré de leucocytes intacts, est capable d'exercer une certaine fibrinolyse sur plaque de fibrine. En partie ce phénomène peut se ramener au fait, que certains leucocytes se montrent plus fragiles vis-à-vis du liquide hémolysant, et sont dès lors susceptibles de libérer une partie de leurs protéases. Mais les variations observées sont faibles, de sorte que cette méthode est applicable à la pathologie.

2°) - Dans les hémopathies

La fibrinolyse par le concentré de leucocytes intacts, est augmenté dans la plupart de nos cas de polycythémies et de lymphoses.

a) - Dans les polycythémies, il faut tenir compte du fait que, pour aboutir à l'hémolyse totale, il faut augmenter les quantités de liquide hémolysant; d'où une destruction plus poussée des leucocytes avec libération de leurs protéases.

Cependant les variations de cette fibrinolyse au cours de l'évolution de la maladie chez un sujet, relèvent d'une pathogénie plus complexe.

b) - Dans les lymphoses, cette fibrinolyse pourrait ex-

primer la fragilité cellulaire, dont l'importance est attestée par les ombres de Gumprecht sur les frottis.

c) - Dans les myéloses, le pouvoir fibrinolytique du concentré leucocytaire n'est pas augmenté (cellules pauvres en protéases ou particulièrement résistantes à la lyse).

Dans les cas que nous avons pu suivre, un rapport entre l'évolution clinique et hématologique d'une part, et la fibrinolyse d'autre part, s'est toujours manifesté, de sorte que ce phénomène pourrait avoir une signification clinique et pronostique.

Vu :
Strasbourg, le 27 septembre 1963

LE PRESIDENT DE THESE

signé : G. MAYER

Vu :
Strasbourg, le 2 Octobre 1963

LE DOYEN DE LA FACULTE
DE MEDECINE

signé : R. FONTAINE

Vu et permis d'imprimer
Strasbourg, le 4 Octobre 1963.

LE RECTEUR DE L'ACADEMIE
PRESIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITE

signé : J.F. ANGELLOZ

- B I B L I O G R A P H I E -

ACHALME
Recherche sur la présence de ferments solubles dans le pus.
C.R.Soc.Biol. (Paris), 1899, p.568-570.

ALBRECHTSON O.K., STORM O., TROLLE D.
Fibrinolytic activity in the circulating blood following amniotic fluid infusion.
Acta Haemat. (Basel), 14, 1955, p.309-312.

ARCHER R.K.
Studies with eosinophil leucocytes isolated from the blood of the horse.
Brit.J.Haemat. 6, 1960, p.229-240.

ASTRUP T.
Fibrinolysis in the organism.
Blood, 2, 1956, p.781-800.

ASTRUP T., ALKJAERSIG V.
Estimation of proteolytic enzymes by means of their fibrinolytic activity.
Arch. Biochem. 37, 1952, p.99-105.

ASTRUP T., CROOKSTON J., MAC INTYRE A.
Proteolytic enzymes in blood.
Acta Physiol. Scand., 21, 1950, p.238-248.

ASTRUP T., DARLING S.
Investigations on fibrinogen.
Acta Physiol. Scand., 4, 1942, p.45-58.

ASTRUP T., DARLING S.
Contribution to the chemistry of prothrombin.
Acta Physiol. Scand., 5, 1943, p.97-101.

ASTRUP T., MULLERTZ S.
The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity.
Arch.Biochem., 40, 1952, p.246 - 350.

ASTRUP T., PERMIN M.
Fibrinolysis in the animal organism.
Nature, 159, 1947, p.681 - 682.

BARNHART M.I., RIDDLE J.M.
Cellular localization of profibrinolysin.
Blood, 21, 1963, p. 306 - 319.

BESSIS M.C.
Une méthode permettant l'isolation des différents éléments figurés du sang.
Le Sang , 14, 1940, p. 262 - 264.

BITTORF A.
Ueber die Verteilung des proteolytischen Leukozytenferments und seines Antiferments, in Harn, Blut und Auswurf.
Im Verlange der kruppösen Pneumonie.
Deutsch.Arch.klin.Med., 91, 1907, p. 212 - 224.

BOCHENDAHL A., LANDWEHR H.A.
Chemische Untersuchung leukämischer Organe.
Virchow Arch.Path.Anat., 84, 1881, p.561 - 567.

CAEN J., MATHE G., LE XUAN CHAT. BERNARD J.
Etude de la fibrinolyse au cours des hémopathies malignes.
C.R. 6 ème Congrès Soc.Europ.Hémat.Copenhagen, 1957, pp.1096, 502 - 505.

VAN CREFELD S., MOCHTAR S.A.
Fibrinolysis in acute Leukaemia.
Ann.Paediat.(Basel), 1960, p. 65 - 74.

DASTRE A.
Fibrinolyse dans le sang.
Arch.Physiol.norm.Path., 25, 1893, p. 661 -663.

DASTRE A.
La digestion saline de la fibrine.
Arch.Physiol.norm.Path., 26, 1894, p.919 -929.

DASTRE A.
Digestion sans ferments digestifs.
Arch.Physiol.norm.Path., 26, 1894 p. 464 - 471.

DAUSSET J., NENNA A., BRECY H.
Leucoagglutinins in chronic idiopathic or symptomatic pancytopenia and paroxistal nocturnal hemoglobinuria.
Blood , 9, 1954, p.696 - 718.

DEMUTH F., RIESEN I.
Eiweisstoffwechsel, normale und bösartige Gewebe in vitro.
Biochem.Z. , 203, 1928, p. 21 - 49.

DENIS P.S.
Essai sur l'application de la chimie à l'étude physiologique du sang de l'homme, et à l'étude physico-pathologique,hygiénique et thérapeutique des maladies de cette humeur.
Paris, Bechet jne, 1838, 366 pp.

ENSELME J., DREYFUS J.C.
Seméiologie électroforétique des protéines du plasma sanguin et de l'hémoglobine.
Lyon, Ed.Camugli, 1955, 255 pp.

ENGELFRIET C.P., VAN LOCHEM J.J.
Studies on leucocutes iso and anti bodies.
Brit.J.Haemat., 7, 1961, p. 223 - 237.

ERBEN F.
Ueber die Ursache der Peptonbildung im leukämischen Blut.
Z.Heilk., 1903, 24-2, p.70 - 79.

FIESSINGER N.
Leucémie aigue myélogène à forme hémorragique.
Exposé des titres et travaux scientifiques.
1910, Paris, Schlaeber, 66 pp.

FIESSINGER N.
Les ferments des leucocytes.
Masson & Cie, Paris, 1923, p.237.

GIROUD G., CAZAL P., LATOUR H., IZARN P., LEVY A., BARJON P. RIBSTEIN M.
Syndrome hémorragique mortel par fibrinolyse aigue au cours d'une leucose myéloide.
Le Sang , 25,1954, p. 628 - 632.

GRABAR P., SELIGMAN M., BERNARD J.
Isolation des leucocytes.
Ann.Inst. Pasteur, 88, 1955, p. 548 - 562.

HAMMARSTEN O.
Ueber den Faserstoff und seine Entstehung aus dem Fibrinogen.
Pflüger Arch.Ges.Physiol., 30, 1883 p. 437-484.

HEDIN S.G., ROWLAND S.
Ueber ein proteolytisches Enzym in der Milz.
Hoppe Seiles Z.Physiol.Chem.,32, 1901, p.340-349.

HEDIN S.G.
Investigations on the proteolytic enzymes of the splin of the ox.
J.Physiol.(London), 30, 1904, p. 195 - 201.

HEDIN S.G.
On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox.
J.Physiol. ,(London), 30, 1904, p.195 - 201.

HERBEUVAL R., HERBEUVAL H.
Technique de concentration leucocytaire pour la mise en évidence de cellules anormales dans le sang.
C.R.Acad.Sci., 250, 1960, p. 3070 - 3072.

HOFMEISTER .
Ueber das Pepton des Eiters.
Z.Physiol.Chem., 4, 1880, p. 268 - 281.

JOBLING J.W., STROUSE S.
The extent of leucocytic proteolysis.
J.Exp.Med., 16, 1912, p. 269 - 279.

JOCHMANN G., KANTOROWICZ A.
Zur Kenntnis der Antifermente im menschlichen Blutserum.
München.Med.Wschr., 1908, p.728 - 730.

JOCHMANN G.
Zur Bedeutung des proteolytischen Leukozytenferments für die pathologische Physiologie.
Virchow Arch.Path.Anat., 194, 1908, p. 342-365.

JOCHMANN G., MULLER E.
Weitere Ergebnisse unserer Methode zum Nachweis proteolytischer Fermentwirkungen.
Munchen.Med.Wschr., 40, 1906, p. 2002 - 2004.

JOHNSON S.A., SCHNEIDER C.L.
The existence of antifibrinolysin activity in platelets.
Science, 117, 1953, p.229 - 230.

JURGENS J.
Das Verhalten des fibrinolytischen Systems bei der Leukämie.
Folia Haemat., 8, 1963, 1-4, p. 52 - 73.

KLEINMANN H., SCHAAR H.
Untersuchungen ueber tierische Gewebstroteasen, ueber proteolytische Fermente in den weissen Blutkörperchen verschiedener Tierarten.
Biochem.Z., 251, 1932,p. 275 - 327.

KOSSEL H., MULLER FR.
Beiträge zur Lehre vom Auswurf.
Z.klin. Med., 13, 1888, p. 149 - 162.

LANDSTEINER K.
Zur Kenntnis der antifibrinfermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe.
Zbl.Bakt., 27, 1900, p. 357 - 362.

LASSEN M.
Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method.
Acta Physiol.Scand., 27, 1952, p. 371 - 375.

MAC FARLANE R.G., BIGGS R.
Fibrinolysis. Its mechanism and significance.
Blood , 3, 1948 p. 1167 - 1183.

MAUPIN B., CHARY R.
Présentation d'une nouvelle méthode de séparation des leucocytes et des plaquettes sanguines.
Le Sang , 23, 1952, p. 336 - 340.

MILSTONE H.
Factor in normal human blood which participates in streptococcal fibrinolysis.
J.Immunol. , 42, 1941, p.109 - 116.

MINOR A., BURNET L.
A method for isolating living polymorphonuclear leucocytes from peripheral blood.
Blood, 4, 1949 p.667 - 674.

MOUNTER L.A., ATIYEH W.
Proteases of human leucocytes.
Blood , 15, 1960, p. 52 - 59.

MULLER E.
Ueber das Verhalten des proteolytischen Leukozytenferments und seines Antiferments in den normalen und krankhaften Ausscheidungen des menschlichen Körpers.
Deutsch.Arch.klin. Med.,1908, 91, p. 291- 308
92, p. 199- 216.

MULLER E., JOCHMANN G.
Ueber eine einfache Methode zum Nachweis proteolytischer Fermentwirkungen (nebst einigen Ergebnissen besonders bei Leukämie).
München.med.Wschr., 53,1906 p. 1393 - 1395.

MULLER E., JOCHMANN G.
Ueber proteolytische Fermentswirkungen der Leukozyten.
München.med.Wschr., 55,1909, p. 1507 - 1510.

MULLER E., KOLACZECK.
Weitere Beiträge zur Kenntnis des proteolytischen Leukozytenferments und seines Antiferments.
München.med.Wschr, 1907, p. 354 - 357.

MULLERTZ S.
Formation and properties of the activator of plasminogen and of human and bovine plasmin.
Biochem.J., 61, 1955, p. 424 - 434.

NOLF P.
Modifications de la coagulation du sang chez le chien après extirpation du foie.
Arch.Int. Physiol., (Liège) 3, 1905-1906, p. 1 - 43.

NILSSON I.M., SJOERDSMA A., WALDENSTRÖM J.
Antifibrinolytic activity and metabolism of aminocarpin acid in man.
Lancet , 1960, p. 1322 - 1326.

OPIE E.L., BARKER E.
Leucoproteases and antileucoproteases of mammels and of birds.
J.Exp.Med., 9, 1907, p. 207 - 221.

OPIE E.L.
Enzymes and antienzymes of inflammatory exudates.
J.Exp.Med., 3, 1905, p. 316 - 334.

PERMIN P.
The fibrinolytic activator in animal tissue.
Acta Physiol. Scand., 21, 1950, p. 159 - 166.

PERMIN P.
Two simple methods of determining fibrinolytic enzymes.
Acta Physiol.Scand., 20, 1950 p. 389 - 393.

PFEIFFER TH.
Ueber autolyse leukämischen und leukozytischen Blutes.
Wien.klin.Wschr. 1906, p. 1249 - 1252.

PISCIOTTA A.V., SCHULTZ E.J.
Fibrinolytic purpura in acute leucemia.
Amer.J.Med. ,19, 1955, p. 824 - 827.

ROSENTHAL R.L.
Acute promyelocytic Leukemia associated with hypofibrinogenemia.
Blood , 21, 1963, p. 495 - 505.

RULOT H.
Intervention des leucocytes dans l'autolyse de la fibrine.
Arch.Int.Physiol., I, 1904, p. 152 - 158.

SHERRY S., LINDMEYER R.I., FLETCHER A.P., ALKJAERSIG N.
Studies on enhanced fibrinolytic activity in man.
J.Clin.Invest., 38, 1959, p. 810 - 821.

SINGER T.P., SILBERBACH I., SCHWARTZ S.
The preparation of morphologically intact leucocytes from peripheral blood by means of gramicidin and lysolecithin.
Blood, special issue I, 1947, p. 88 - 97.

SPEAR F.
Separation of leucocytes frim whole blood by flotation on gum acacia.
Blood , 3, 1948, p. 1055 - 1056.

SZILARD P.
Eine Methode zur isolierten Gewinnung der weissen Blutkörperchen.
Pflüger Arch.ges.Physiol., 211, 1926 p.597-602.

TROLL N., SHERRY S., WACHMAN
The action of plasmin on synthetic substrates
J. Biol. Chem. 208, 1954, p.85-93.

TULLIS J.

Separation and purification of leucocytes and platelets.
Blood , 7, 1952,, p. 891 - 896.

VANOTTI A.

Die enzymatische Aktivität der Leukozyten in der menschlichen Physiopathologie und die klinische Bedeutung der biochemisch-analytischen und zellchemischen Nachweismethoden.
Zyto und Histochemie in der Hämatologie.
Neuntes Freiburger Symposium, 1963,
Berlin, Springer Verlag pp.624, p. 349 -359.

DE VRIES S.I., BRAAT-VAN TRAATEN M.A.J., MULLER E.,WETTERMARK M

Antiplasmin deficiency in polycythaemia : a form of thrombopathy .
Thromb.Diath.Haemorrh., 6, 1961, N° 4/6, p. 445.

VALLEE B.L., HUGES W.L., GIBSON J.G.

A method for the separation of leucocytes from whole blood by flotation on serum albumin.
Blood , special issue I, 1947 , p. 82 - 86.

WIENS D.

Untersuchungen ueber die Beeinflussung des proteolytischen Leukozytenferments durch das "Antiferment" des Blutes.
Deutsch.Arch. klin.Med.,14, 1907, 91, p.456-468.

WILLSTATTER M., BAMANN E. ROHDEWALD M.

Zur Kenntnis der proteolytischen Wirkungen farbloser Blutkörperchen.
Z.Physiol.Chem. , 185, 1929, p. 265 - 280.

- TABLE DES MATIERES -

Pages

INTRODUCTION 2

A.- Les protéases de leucocytes et la fibrinolyse . 2
B.- Activité fibrinolytique au cours des hémopathies 6

Chapitre I :

TECHNIQUES 8

A.- Isolement des leucocytes 8

1°) - Différentes méthodes connues 8
2°) - Technique de leucoconcentration 9

a) - Récolte du sang pour la préparation du concentré leucocytaire 10
b) - Préparation du concentré leucocytaire 11
c) - Numération des leucocytes dans le concentré leucocytaire 14
d) - Etalements sur lames à partir des concentrés leucocytaires 15

B.- La plaque de fibrine 16

1°) - Méthode proposée 16
2°) - Justification du choix de la méthode . . 18

C.- Les euglobulines du plasma 20

1°) - Récolte du sang pour la préparation des euglobulines du plasma 20
2°) - Précipitation des euglobulines du plasma 21

a) - Principe de la méthode 22
b) - Méthode employée 22

D.- Mise sur plaque de fibrine du concentré leucocytaire 24
E.- Mise sur plaque de la suspension d'euglobulines 24
F.- Lecture des résultats 25
G.- Techniques diverses 26
H.- Numération des plaquettes 26
I.- Technique des euglobulines en tube 27

/....

(Suite)

Pages

Chapitre II :

RESULTATS CHEZ LE SUJET NORMAL 29

A.- Résultats 29

B.- Discussion 30

a) - Variations dues au matériel d'expérience 31

b) - Variations individuelles 33

C.- Conclusion 37

Chapitre III :

RESULTATS DANS QUELQUES CAS D'HEMOPATHIES . . 38

A.- Résultats 39

Leucose à promyélocytes 43

Maladie de Hodgkin 44

Polycythémie 45

Lymphoses 47

Affections diverses 48

Chapitre IV :

EVOLUTION DE LA FIBRINOLYSE CHEZ UN MEME SUJET 48

Discussion 48

Conclusion 50

CONCLUSIONS 51

BIBLIOGRAPHIE 53